Untersuchungen über die Keimzahl und den Dissoziationsgrad von flüssigen Abortus-Bang-Impfstoffen (Stamm Buck 19) bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Edmund Haug

Aus dem Tierhygienischen Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. A. M e y n
und dem Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt Stuttgart
Vorstand: OReg. Vet. Rat Dr. O. S c h e u

Untersuchungen über die Keimzahl und den Dissoziationsgrad von flüssigen Abortus - Bang - Impfstoffen (Stamm Buck 19) bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Edmund H a u g
aus
Beihingen / Württemberg

München 1958

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Z i p f

Referent: Professor Dr. A. M e y n

Tag der Promotion: 26. II. 1958

U N I - Druck, München 13, Amalienstraße 85

Meinen lieben Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555216_0013

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Literatur	2
	1. Die immunisatorische Bedeutung der Keimzahl im Lebendimpfstoff	2
	2. Die kulturelle Keimzählung von Bang-Impfstoffen	3
	3. Dissoziation	6
III.	Eigene Versuche	11
	1. Material	11
	2. Methodik	11
	3. Versuche und Versuchsergebnisse	13
	4. Untersuchungen über die Dissoziation der Impfstoffe bei verschiedenen Lagerungsbedingungen	18
IV.	Besprechung der Ergebnisse	23
V.	Zusammenfassung	30
VI.	Literatur	32
VII.	Lebenslauf	35

I. Einleitung

Bei der Bekämpfung der Rinderbrucellose steht Erfassung und Ausmerzung der Reagenten im Vordergrund. In stark verseuchten Gehöften wird vielerorts auch die Schutzimpfung der Jungtiere durchgeführt. Dazu wird gegenwärtig der Stamm "Buck 19" bevorzugt, der als Lebendimpfstoff in flüssiger oder gefriergetrockneter Form verwendet wird.

Keimzahl und Dissoziationsgrad der Brucellen sind für die Ausbildung der Immunität von Bedeutung. Sie müssen deshalb bei der Herstellung der Impfstoffe berücksichtigt werden. Die flüssigen Lebendimpfstoffe sind nur relativ kurze Zeit verwendbar, da trotz des Einhaltens der vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen (Kühlschrank) ein Absinken der Keimzahl beobachtet worden ist. Unter den praktischen Arbeitsbedingungen des Tierarztes ist es aber nicht immer möglich, die vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen einzuhalten. Es sollte deshalb in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob und wie verschiedene Aufbewahrungsverhältnisse Keimzahl und Dissoziationsgrad flüssiger Lebendkulturen des Stammes "Buck 19" beeinflussen.

II. Literatur

1. Die immunisatorische Bedeutung der Keimzahl im Lebendimpfstoff

Die Minimaldosis, das ist der Gehalt an lebenden Brucellen des Stammes 19, die nötig ist, um einen entsprechenden Impfschutz bei subkutaner, intradermaler oder einer anderen Applikationsart zu verleihen, ist bis jetzt noch nicht bekannt (W H O (24)). Es wurde daher vom Fachausschuß der W H O beschlossen, daß gegenwärtig die Empfehlung für eine Dosis von etwa 60 Mrd. lebender Keime beibehalten werden soll. Der Ausschuß betont, daß die Vaccine zur Zeit der Injektion den vollen Gehalt an lebenden Keimen haben muß.

S e e l e m a n n (20) empfiehlt bei der Impfung der Jungtiere im gesamten Bundesgebiet möglichst einheitlich vorzugehen. Als Impfdosis schlägt er zweimal 15 Mrd. lebender Keime in Abständen von etwa vier Wochen vor.

B e r g m a n n (1), der die Schwierigkeit bei der Festlegung der optimalen Keimzahl vor allem darin sieht, daß es bisher an einer exakten Methode fehlt, mit welcher der Grad der Immunität beim schutzgeimpften Rind bestimmt werden kann, empfiehlt eine zweimalige Impfung im Abstand von 3 - 4 Wochen mit einer Keimmenge von je 10 Mrd. pro Dosis. Damit aber die Gewähr gegeben ist, daß bei der Verimpfung des flüssigen, gegen äußere Einflüsse relativ empfindlichen Impfstoffes dennoch genügend lebende Keime verabreicht werden, führt man vielerorts, so auch in der Schweiz, eine zweimalige Impfung mit einem Intervall von 2 - 4 Wochen durch. Der Autor begründet diese Maßnahme an Hand einer angeführten Wahrscheinlichkeitsrechnung. Dieser wird zu Grunde gelegt, daß 20 v.H. der mit flüssigem Impfstoff schutzgeimpften Rinder bei der ersten Impfung nicht genügend Brucellen für die Ausbildung einer Immunität erhalten. Die Zahl der Versager kann durch die zweite Impfung auf 4 herabgesetzt werden.

Hinsichtlich der Bonner Richtlinien hat D r a e g e r mitgeteilt, daß die "Zweimalimpfstoffe" nach der Herstellung 5 Mrd. lebender Keime pro ccm enthalten sollen. Die Keimzahl soll bis zur Verwendung nicht unter 2,5 Mrd. absinken. Bei einer Impfdosis von 2 mal 5 ccm kann die verabreichte Keimmenge also zwischen 25 und 50 Mrd. schwanken.

Zusammenfassend ergibt sich, daß für die Erlangung einer ausreichenden Immunität beim Rind Keimzahlen zwischen 20 und 60 Mrd. angewendet werden.

2. Die kulturelle Keimzählung von Bangimpfstoffen

Für die Keimzählungen werden von den verschiedenen Untersuchern unterschiedliche Verfahren angewandt, die alle mehr oder weniger genaue Ergebnisse erbringen.

Da in Impfstoffen, sei es, daß es sich um Abschwemmungen von festen Kulturen von irgend einem Nährmedium, oder um in Nährflüssigkeiten gezüchtete Bangbakterien handelt, nach einer gewissen Aufbewahrungszeit wohl immer mit einem mehr oder weniger starken Absterben, also einer Abnahme der lebenden Keime zu rechnen ist, entschied sich S e e l e m a n n (19) in erster Linie für die Anwendung des indirekten Zählverfahrens. Wurde die Bakterien-Abschwemmung eine gewisse Zeit aufbewahrt, so ergaben sich naturgemäß bei dem direkten Verfahren gewöhnlich höhere Keimzahlen, weil bei diesem auch die toten Keime mitgezählt wurden. Für die indirekte Keimzahlbestimmung wurde von S e e l e m a n n Serum-Glycerinagar verwendet, der auf einen ph-Wert von 6,8 eingestellt war. Der technischen Durchführung wurde von ihm das Verdünnungsverfahren nach D e m e t e r zu Grunde gelegt.

Bei allen Impfstoffen, die durch Abschwemmung von festen Nährbodenkulturen hergestellt waren, wurden zum Vergleich auch in jedem Falle die Durchlässigkeitswerte des Zeiß'schen Pulfrich-Photometers für kolorimetrische Messungen und Absorptionsmessungen unter Benutzung einer B-Küvette von einer Schichtdicke von 0,5 cm ermittelt. Zu dieser Prüfung der Veränderungen der Keimzahlen wurden in den frisch hergestellten Impfstoffen die Keimzahlen bestimmt, diese sodann nach gewissen Aufbewahrungszeiten bei 12 - 15° C wiederholt festgestellt und gegenseitig verglichen.

S e e l e m a n n prüfte dazu die Impfstoffe "Zinna" (Kieler Stamm), "D" (Mischimpfstoff aus 7 Stämmen) und "USA 19". Bei den im Institut hergestellten Impfstoffen handelte es sich um Abschwemmungen von festen Kulturen. Als Aufbewahrungsflüssigkeiten dienten

a) gepufferte Kochsalzlösungen,
b) gepufferte Kochsalzlösung + Glycerin-Bouillon im Verhältnis 5 : 1 (pH 7,2) und
c) reine Glycerin-Bouillon ph 7,2 (2 v.H. Glycerin).

Die Ergebnisse S e e l e m a n n s von der Prüfung des Impfstoffes "USA 19" sind in nachfolgender Tabelle I zusammengefaßt.

Tabelle I

Alter des Impfstoffes	Keimzahlen in Milliarden			Bemerkungen
	a)	b)	c)	
frisch	3,8	4,4	4,4	Virulenzprüfung
3 Tage	3,4	4,5	4,4	
1 Woche	2,8	4,0	4,2	
2 Wochen	1,4	3,8	4,4	Virulenzprüfung
3 Wochen	0,7	3,7	4,3	
4 Wochen	0,6	2,7	4,4	Virulenzprüfung
6 Wochen	0,22	0,8	3,3	
8 Wochen	0,13	0,6	0,8	

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß in verschiedenen Medien bei gleicher Lagerungszeit eine unterschiedliche Abnahme der lebenden Bakterien erfolgte.

Nach B e r g m a n n (1) wird die wichtige Forderung nach Verabreichung einer großen Zahl lebender Brucellen zweifellos in Frage gestellt durch die kurze Haltbarkeitsdauer der bisher und teilweise heute noch zur Anwendung gelangenden flüssigen Impfstoffe, die nichts anderes darstellen, als eine Abschwemmung von Oberflächenkulturen mit physiologischer Kochsalzlösung. Es ist bekannt, daß die optimale Lagerungstemperatur für gefriergetrocknete Bakterien zwischen 1 und 5° C liegt und, daß je höher diese Temperatur steigt, die Keime desto schneller absterben. Schon bei Zimmertemperatur von 18° C geht das Absterben erheblich rascher vor sich. Er setzte deshalb verschiedene Impfstoffe einer Belastungsprobe im Brutschrank bei 37° C aus und stellte dabei fest, daß Proben, deren Keimzahlen im Brutschrank verhältnismäßig langsam abnehmen, auch ein längeres Überleben bei Zimmertemperatur und erst recht im Kühlschrank zeigten als Impfstoffe mit verhältnismäßig kurzer Haltbarkeitsdauer bei Zimmer- und bei Kühlschranktemperatur. Es zeigte sich also, daß die Geschwindigkeit des Absterbens bei Zimmer- und Kühlschranktemperatur zu der Belastungsprobe im Brutschrank in einem bestimmten Verhältnis steht. Deshalb können aus der Überlebensdauer der Keime bei 37° C Rückschlüsse auf die Haltbarkeitsdauer der Impfstoffe bei Zimmer- und Kühlschranktemperatur gezogen werden.

Zur technischen Durchführung hat B e r g m a n n das einfache Verdünnungsverfahren mit jeweiligem Pipettenwechsel angewandt, wobei 1 ccm der Endverdünnung mit 9 ccm verflüssigtem Nähragar zu Platten ausgegossen wird.

Zur Verdünnung benützt er Rindfleischbouillon (ph 7,5), wobei immer 0,5 ccm auf 49,5 ccm Bouillon weiter verdünnt werden, bis eine Endverdünnung von 10^{-8} erreicht wird. Von der Endverdünnung wird 1 ccm zu 9 ccm verflüssigtem und wieder auf 43 - 46° C abgekühltem Tryptose-Agar "Difco" gegeben, der, in Röhrchen abgefüllt, im Wasserbad bereitsteht. Es werden von jeder Verdünnung 2 Platten ausgegossen und bei der Keimzählung das Durchschnittsergebnis beider Platten notiert. Das Ausspateln von 0,1 ccm der Endverdünnung auf die Oberfläche von Nähragar sowie die Bestimmung der Keimzahl im Warburg'schen Apparat lehnt B e r g m a n n aus Gründen der Ungenauigkeit und noch aus "verschiedenen anderen Gründen" ab.

Amerikanische Autoren befassen sich schon seit längerer Zeit mit der Bestimmung der Keimzahl von Abortus-Bang-Impfstoffen. So verwandte V e r w e y (21) bei der Keimzählung von gefriergetrocknetem Impfstoff ebenfalls Tryptose-Agar. Es wurden 2 Platten ausgegossen, bei 37° C 5 Tage lang bebrütet und der Mittelwert errechnet.

Die B e h r i n g w e r k e (D r a e g e r (5)) verfahren nach einer "Anweisung für die Bestimmung der Keimzahl bei Brucella abortus, insbesondere des gefriergetrockneten Abortus-Bang-Impfstoffes (Stamm Buck 19)". Danach wird die Bestimmung der Zahl der lebenden Keime im vereinfachten Plattengußverfahren durchgeführt, wobei die Verdünnungsreihen in Hunderterpotenzen angelegt werden. Bei der Verdünnung werden immer 1 ccm auf 99 ccm Verdünnungsflüssigkeit gegeben, die aus Pferdebouillon (ph 7,6) besteht. 6 sterile Petrischalen werden in einer Reihe so aufgestellt, daß ihr Deckel nach oben zeigt. Von der Endverdünnung 10^{-8} werden nach gründlichem Mischen in jede der 6 Platten je 1 ccm mit steriler Pipette am Rand der Schale abgesetzt. Als Nährboden wird Bakto-Tryptose-Agar folgender Zusammensetzung verwendet:

Aqua dest	1 000,0 ccm
Bakto-Tryptose-Pepton (Difco)	20,0 g
Dextrose	1,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	30,0 g

Der ph-Wert wird auf 6,9 eingestellt.

Der Bakto-Tryptose-Agar wird im Wasserbad auf 50° C abgekühlt und mit 10 % inaktiviertem Pferdeserum versetzt. Anschließend werden die Platten damit ausgegossen, wobei der Agar beim Gießen an der Stelle zuerst auf die Platte treffen muß, die der Endverdünnung gegenüberliegt. Damit soll erreicht wer-

den, daß sich die Temperatur des Agars von 50° C nicht nachteilig auf die Keimzählung auswirken kann. Nach 6 Tage langer Bebrütungszeit bei 37° C werden aus den Einzelergebnissen der 6 Platten die Durchschnittswerte errechnet.

Um das Erkennen der zum Teil kleingewachsenen Brucellenkolonien in und auf den Agarplatten bei der Keimzählung zu erleichtern, fügte B ö r g e r (2) dem von ihm verwendeten 2 %igen Glycerin-Fleischextrakt-Agar Tetrazolpurpur bis zur Endkonzentration 1 : 40 000 zu, wodurch sich die Brucella-Kolonien blau färben und deutlich vom ungefärbten Agar abheben. Außerdem sollen sie sich dadurch von Luftblasen im Agar leichter unterscheiden lassen. Bei einer Konzentration von 1 : 40 000 wirkt Tetrazolpurpur, wie B ö r g e r weiter ausführt, nicht hemmend auf das Wachstum von Brucellen, wohl aber vermag es andere Mikroorganismen (grampositive Kokken, Bakterien und Bazillen) zu hemmen.

3. Dissoziation

Wie eingangs schon erwähnt, ist die Wirksamkeit des Impfstoffes nicht nur von der Anzahl der lebenden Keime, sondern auch vom Dissoziationsgrad der Brucellen abhängig. Deshalb hat der Fachausschuß der W H O beschlossen, daß sich der Impfstoff zur Zeit der Injektion in einem nicht dissoziierten Zustand befinden muß.

Früher hat man bei den Brucellen wie auch bei anderen dissoziierenden Mikroorganismen nur eine S-(Smooth) und R-(Rough)Form angenommen (M a r s h a l l und J a r e d (12) 1931, F r e n d z e l und S z y m a n o w s k i (6) 1931, P a n d i t und W i l s o n (14) 1932). Die Erforschung der Dissoziation der Brucellen erhielt erst ihre sichere Grundlage, als es H e n r y (7) 1933 gelungen war, die bei normaler Beleuchtung kaum wahrnehmbaren Unterschiede der Kolonieform bei den einzelnen Varianten zu analysieren. Es zeigte sich bald, daß bei den Brucellen eine größere Zahl von Varianten vorkommt. H u d d l e s o n (10), der sich besonders eingehend mit Untersuchungen über die Dissoziation befaßte, bezeichnete eine von P l a s t r i d g e und M c A l p i n e (16) 1933 beschriebene Mucoid-Form als M-Form. Zu den bereits bekannten Wuchsformen beschrieb er noch weitere Dissoziationsformen und faßte sie dann alle in folgendem Schema zusammen:

$$OW - S_1 - S - I_1 - I_2 - R - M \ (Ma_1, Ma_2, Ma_3).$$

Diese Formen alle zu unterscheiden, setzt sehr viel Erfahrung auf diesem Gebiet voraus.

In Tierversuchen konnten K r a f z e l (11) und S c h i n d l e r (18) Unterschiede in Bezug auf Virulenz, immunogene Eigenschaften und serologisches Verhalten zwischen S-Kulturen und Kulturen mit Varianten feststellen. Sie sind daher der Ansicht, daß sich in erster Linie die S-Stämme zur Herstellung eines gut wirksamen Impfschutzes eignen. Als Grund für das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Brucella-Varianten gegenüber der S-Form konnte das Fehlen des Endotoxins bei den Varianten ermittelt werden. Nach T r a u m (21) ist die S-Form des Stammes 19 für die Impfstoffproduktion zu bevorzugen. Die von den S-Formen abgespaltenen Varianten sind mehr oder weniger unwirksam.

Während nun für die Immunisierung im allgemeinen die S-Formen verwendet werden, haben P r i e s t l e y und M c E v e n (17) sowie H u d d l e s o n (9) Varianten von Brucellen verwendet. M c E v e n und P r i e s t l e y verwendeten einen R-Stamm, der nicht in der Lage war, Agglutinine zu erzeugen. Aussichtsreicher scheint der Versuch von H u d d l e s o n mit der sogenannten M-Vaccine zu sein, die aus der Mucoid-Form der Brucella suis besteht. In Amerika sollen bereits erfolgreiche Versuche mit diesen Impfstoffen in der Praxis angestellt worden sein.

Für das Verfahren nach H e n r y zur mikroskopischen Feststellung von Dissoziationsformen verwendet man am besten (W H O (21) ' und S c h i n d l e r (18)) ein binokulares Mikroskop mit großem Gesichtsfeld. Das unter einem Winkel von 45° reflektierte Licht fällt durch den Boden der Petrischale ein. Bei dieser Untersuchungsmethode erscheinen die S-Kolonien mattgrün oder graublau mit glatter Oberfläche, während die Oberfläche von R-Kolonien das Aussehen von Glasstaub hat und hell aufleuchtet. Für die Mucoidform erwähnt H e n r y als konstantestes Merkmal die kastanienbraune Farbe ihrer Kolonie. H u d d l e s o n (8) unterscheidet zwei I-Typen, die er mit I_1 und I_2 bezeichnet und die sich durch verschieden starke Trübung ihrer Kolonie erkennen lassen. Die Vitalfärbung der Plattenkulturen mit Kristallviolett wurde, wie U l b r i c h (22) berichtet, von W h i t e und W i l s o n (25) für die Differenzierung der Brucella-Dissoziationsformen eingeführt. Man verwendet dazu eine 1 : 2000 verdünnte wässrige Kristallviolettlösung, indem man die Platten vorsichtig mit der Farblösung überschichtet und die Flüssigkeit nach 20 Sek. wieder abgießt. Die vitalgefärbten Kolonien betrachtet man am besten mit dem

binokularen Stereo-Plattenmikroskop bei der Beleuchtung nach H e n r y. Auf Grund der unterschiedlichen Anfärbbarkeit der Kolonien bzw. Koloniesektoren lassen sich mehrere Dissoziationsformen unterscheiden. Die S-Formen sind bläulich, die I-Formen violett und die R-Formen rot.

Bei der Verwendung von Tetrazolpurpurnährböden zur Züchtung und Keimzählung von Brucellen konnte nach B ö r g e r (2) gleichzeitig festgestellt werden, daß ein Nährboden mit Zusatz von Tetrazolpurpur geeignet ist, die Bildung von Dissoziationsformen im Mikroskop bei Lupenbetrachtung im durchfallenden Licht sichtbar zu machen. Tetrazolpurpur wird von lebenden Zellen in deren Innerem zu einem dunkelvioletten Farbstoff reduziert. Tetrazolpurpur ist in Wasser gelöst schwach gelblich gefärbt und wird im Gegensatz zu TTC durch Licht nicht verändert. Als Nährboden wurde Kartoffel-Glycerin-Agar verwendet, dem vor dem Gießen der Platten eine Tetrazolpurpurlösung bis zur Endkonzentration von 1 : 20 000 zugesetzt wurde (z.B. 1 ml einer 0,2 % wässrigen Tetrazolpurpurlösung auf 100 ml Kartoffel-Glycerin-Agar). Der Nährboden ist vor seiner Verwendung 48 Std. bei 47° C zu bebrüten, damit er gut abtrocknet. Die R-Formen erscheinen infolge ihres stärkeren Reduktionsvermögens dunkelviolett, die S-Formen gelbviolett gefärbt. Eine spontane Dissoziation auf Grund des Tetrazolpurpurzusatzes zum Nährboden konnte nicht beobachtet werden. Die Nährbodenplatten sind mit etwas mehr Kultur als gewöhnlich zu beimpfen, da das Wachstum der Brucellen etwas gehemmt wird, und andererseits die Dissoziationsformen im Impfstrich besser zu erkennen sind.

Eine weitere Möglichkeit, glatte und rauhe Brucella-Stämme zu unterscheiden, bietet nach C o t t o n (4) die Kapselfärbung. Dazu wird nach folgender Methodik verfahren. Zunächst werden die Objektträger mit Tusche, 5 %iger wässriger Nigrosinlösung oder Kristallviolett (25 % einer gesättigten alkoholischen Kristallviolettlösung in Wasser) gefärbt und getrocknet. Die 48 Stunden bebrütete Brucella-Kultur wird alsdann ausgestrichen und in folgenden Lösungen gefärbt:

1) 5 Min. in Azur II-Lösung (0,75 g Azur II in 100 ml absolutem Methylalkohol) ohne Spülen eintauchen in
2) Safraninlösung (2,5 g Safranin in 100 ml 95 % Äthylalkohol),
3) Spülen in warmem Leitungswasser.

Der Untergrund erscheint bei Nigrosinfärbung des Objektträgers azurblau, die Kapseln farblos und die Bakterien blaßrot. Glattformen haben einen deutlichen Kapselrand; zentral in der Kapsel liegt der tief gefärbte Zelleib.

Alle Zellen sind bei glatten Formen in Größe und Gestalt einheitlich. Rauhe Formen haben einen unregelmäßigen und wenig ausgeprägten Kapselrand. Die Bakterienzelle erscheint als eine undeutliche, gefärbte Masse in der Mitte oder am Rand der Kapsel. Bei manchen Formen ist der Zelleib mit dieser Methode gar nicht anfärbbar. Intermediäre Formen zeigen mannigfache Variationen dieses Verhaltens.

Als eine sehr empfindliche Methode zur Erkennung der Brucella-Varianten bezeichnet Schindler (18) den von Munger, Myrtle und Huddleson (13) beschriebenen "opsonophagocytischen" Test. Dabei sollen die Varianten von den polymorphkernigen Leukozyten im normalen Zitratblut des Menschen oder Meerschweinchens phagocytiert werden. Bei den S-Formen soll das nicht oder nur in geringem Maße der Fall sein.

Wie Krafzel (11) erwähnt, entspricht das antigene Verhalten nicht immer der vorgefundenen Kolonieform. So kommen nach Braun (3) in der S-Form erscheinende Kolonien mit einem R- oder M-Antigen vor. Diese Typen werden mit S^R bzw. S^M bezeichnet. Dementsprechend gibt es auch M- oder R-Formen mit S-Antigenen. Solche Varianten lassen sich nach Schindler (18) mit Hilfe der Spontanagglutination erkennen. Er empfiehlt, die direkt vom Nährboden abgehobenen Kolonien auf einem Objektträger nacheinander in je 1 Tropfen Trypaflavinlösung 1 : 1000, n/HCl, 0,85 % NaCl-Lösung und spezifisch agglutinierendem Serum (1 : 10 verdünnt) zu verreiben. Nach vorsichtigem Schwenken des Objektträgers wird die Reaktion mit einer Lupe abgelesen. Es können folgende Reaktionsarten unterschieden werden:

1. Bakterien, die nur in spez. agglutinierendem Serum zusammengeballt werden. Es sind dies reine S-Formen.

2. Bakterien, die spezifisch in agglutinierendem Serum zusammengeballt werden, außerdem aber auch stets in Trypaflavin. In 0,85 % NaCl-Lösung werden diese Formen niemals agglutiniert. Gegen nHCl verhalten sie sich verschieden. Tendiert ihre Kolonieform mehr zur S-Form, bleiben sie von HCl unbeeinflußt, tendiert sie mehr zur R-Form, werden sie in HCl agglutiniert.

3. Bakterien, die nicht oder nur angedeutet im spezifischen Serum agglutiniert werden, dafür aber in Trypaflavin, n/HCl und meist auch in 0,85 % NaCl-Lösung. Es handelt sich hierbei um reine R-Formen.

Krafzel (11) führt noch weiterhin an, er habe aus den vielen für die Prüfung von S-Stämmen auf Spontanagglutination empfohlenen Reagenzien

die Trypaflavinlösung (1 : 1000) ausgewählt, weil von allen Untersuchern die Spontanagglutination mit Trypaflavin als die empfindlichste Methode beschrieben wurde. Es habe sich jedoch bewährt, daneben noch eine zweite Methode anzuwenden, wofür die Spontanagglutination in HCl verwendet wurde, die er als weniger empfindlich bezeichnet.

W u n d t (26) empfiehlt zur Bang-Test-Herstellung für die Blut- und Milchserumagglutination die Prüfung der Antigene auf ihren Dissoziationsgrad mit der Trypaflavin-Langsamagglutination. Er verwendet dazu zwei Trypaflavinlösungen und zwar in der Konzentration 1 : 500 und 1 : 1 000. Zu je einem ccm dieser Lösungen gibt er einen Tropfen Antigenabschwemmung. Nach 24-stündiger Aufbewahrung im Brutschrank bei 37° C wird das Ergebnis abgelesen. Beim Vorhandensein von R-Formen tritt eine Agglutination auf. Als exaktere Methode bezeichnet W u n d t die "Kochprobe". Dabei werden 2 ccm Antigenabschwemmung 2 Std. im Dampftopf gehalten. Sind R-Formen im Antigen vorhanden, so tritt eine Ausflockung auf, während dies bei S-Formen nicht der Fall ist.

Aus der Vielzahl der Verfahren, die zur Prüfung des Dissoziationsgrades angewandt werden können, erscheint die Spontanagglutination als eine verhältnismäßig einfach durchzuführende und doch exakte und objektive Methode.

III. Eigene Versuche

1. Material

Für meine Untersuchungen standen mir insgesamt 4 Chargen eines "Abortus-Bang-Impfstoffes, Behringwerke, Stamm 19, flüssig, Zweimalimpfstoff" zur Verfügung.*) Diese 4 Chargen untersuchte ich in insgesamt 8 Versuchsreihen, wobei in jeder Versuchsreihe 10 - 12 Impfstoff-Ampullen geprüft wurden. Entsprechend der Zahl der zur Verfügung stehenden Impfstoffampullen wurde für jede Keimzählung innerhalb einer Versuchsreihe jeweils eine frische Ampulle verwendet. Die Impfstoffe von drei Versuchsreihen wurden in der Kühlzelle bei 2 - 5° C, und die Impfstoffe von 2 Versuchsreihen bei Zimmertemperatur (Laborraum) zwischen 20 und 25° C aufbewahrt. Zur Prüfung des Einflusses wechselnder Temperaturverhältnisse sowie der Einwirkung mechanischer Insulte, wie dies unter praktischen Bedingungen des Tierarztes häufig der Fall ist, wurden noch weitere 3 Versuchsreihen durchgeführt, in denen der Impfstoff im Kraftfahrzeug gelagert war. Die drei verschiedenen Lagerungsbedingungen, insbesondere auch die im Kraftfahrzeug, wurden gewählt, um über die Verwendungsdauer des Impfstoffes unter Praxisverhältnissen Aussagen machen zu können. In allen Fällen wurden die originalverpackten Impfstoffampullen in kleinen Pappkartons aufbewahrt. Die Versuchsreihen wurden zweimal wöchentlich in Abständen von 3 bzw. 4 Tagen geprüft. Die Lagerzeit fiel teilweise in die Monate August, September und Oktober des Jahres 1956 und teilweise in dieselbe Zeit des Jahres 1957. Die Kraftfahrzeuge waren Tag und Nacht den Witterungsverhältnissen ausgesetzt.

2. Methodik

Die Bestimmung der Zahl lebender Keime führte ich im Plattengußverfahren durch. Als Nährboden verwendete ich Bakto-Tryptose-Agar, dem 10 % Pferdeserum und Tetrazolpurpur in einer Endkonzentration 1 : 50 000 zugefügt wurde. Der Nährboden setzte sich wie folgt zusammen:

*) Der für meine Untersuchungen erforderliche Impfstoff wurdemir in dankenswerter Weise von der Firma Behringwerke zur Verfügung gestellt.

Aqua dest	1 000,0 ccm
Bakto-Tryptose-Pepton (Difco certified)	20,0 g
Dextrose	1,0 g
NaCl	5,0 g
Agar Agar fein gepulvert	30,0 g

Das Nährbodengemisch wurde auf den ph-Wert von 6,9 eingestellt, 30 Min. im Autoklaven sterilisiert und anschließend in bereitgestellte, hochsterile 250 ccm-Steilbrustflaschen zu je 100 ccm abgefüllt. Die Steilbrustflaschen wurden nach dem Abfüllen noch 10 Min. im Dampftopf gehalten. Für die Herstellung sämtlicher Nährböden wurde das gleiche Grundmaterial sowie die gleiche Herstellungsart eingehalten. Zur Gewinnung des Pferdeserums wurde gesunden Schlachtpferden Blut so steril wie möglich entnommen. Das aus dem Blut gewonnene Serum wurde 30 Minuten lang bis 56° C im Wasserbad inaktiviert und durch Seitzfilter filtriert. Anschließend wurde es zu je 10 ccm in sterile, wattegestopfte Reagenzgläser abgefüllt und in der Kühlzelle aufbewahrt. Die wässerige Tetrazolpurpurlösung wurde in einem Erlenmeyerkolben in einer Konzentration von 1 : 2 000 bei Zimmertemperatur vorrätig gehalten.

Für den Ansatz der Verdünnungsreihen wählte ich physiologische Kochsalzlösung, der ich 1 % Bakto-Tryptose-Pepton zufügte. Die Lösung wurde autoklaviert und auf den pH-Wert 7,6 eingestellt. Es wurden immer 5 l hergestellt und diese dann unter sterilen Kautelen in Literkolben abgefüllt und im Kühlschrank bereitgehalten.

Die Verdünnungen wurden nach folgender Technik angesetzt:

Für jede Untersuchung innerhalb der Versuchsreihen wurden mit einer 50 ccm-Vollpipette je 100 ccm Verdünnungsflüssigkeit in vier 250-ccm-Steilbrustflaschen gegeben. Nach gründlichem Durchschütteln der Impfstoff-Ampulle wurde 1 ccm der Abortus-Bang Lebendkultur mit der Pipette auf 100 ccm der Verdünnungsflüssigkeit (Verdünnung 10^{-2}) übertragen. Der Flasche mit der Verdünnungsflüssigkeit waren vorher sterile Glasperlen zugegeben worden, um in dieser Verdünnungsstufe eine bessere Suspension der Bakterien zu gewährleisten. Die Flasche wurde unter Vermeidung von Schaumbildung mit rotierenden Bewegungen geschwenkt. Nach 2 - 3 Minuten wurde der Inhalt mit einer Pipette durchgemischt und 1 ccm der Verdünnung 10^{-2} auf die nächsthöhere Verdünnungsstufe übertragen, womit die Verdünnung 10^{-4} erreicht wurde. Dieser oben beschriebene Vorgang wurde noch zweimal wiederholt bis

schließlich die Endverdünnung 10^{-8} erreicht war. Da die an den Glaswänden der Pipetten haftenden Keime ein falsches Zählergebnis verursachen können, wurde für jeden Arbeitsgang eine frische, sterile Pipette verwendet. Auch wurde für sämtliche Versuche stets derselbe Pipettensatz benützt.

Die Beimpfung der Nährböden wurde wie folgt durchgeführt:

6 sterile Petrischalen wurden in einer Reihe so aufgestellt, daß ihr Deckel nach oben zeigte. Von der Endverdünnung (10^{-8}) wurde nach gründlichem Mischen in jede der 6 Petrischalen mit einer 10er-Pipette je 1 ccm am Rande der Schale abgesetzt. 100 ccm Bakto-Tryptose-Agar wurden im Wasserbad bis auf 50° C abgekühlt, mit 10 ccm auf 37° C vorgewärmtem Pferdeserum sowie 2,5 ccm der bereitstehenden wässerigen Tetrazolpurpurlösung (1 : 2 000) versetzt. Sofort nach dem Ausgießen wurden die Platten einige Male hin und her gerückt, bis sich Agar und Endverdünnung gut vermischt hatten. Das Rotieren der Platten habe ich vermieden, da hierdurch eine große Zahl der Keime an der Peripherie des Agars wächst, was zu ungenauen Ergebnissen führen kann. Die Platten blieben anschließend, durch sterile Abdecktücher vor direktem Sonnenlicht geschützt, noch ungefähr 1 Stunde, bis zum völligen Erstarren des Agars, bei Zimmertemperatur auf dem Labortisch stehen und wurden dann mit der Nährbodenseite nach oben gekehrt in den Brutraum gebracht. Die Bebrütung erfolgte unter normalen aeroben Bedingungen über 5 Tage bei 37° C. Danach wurden die Kolonien bei schräg einfallendem Tageslicht ausgezählt, indem jede Kolonie nach der üblichen Weise markiert wurde. Es konnten beim Auszählen 3 Brucellen-Kolonieformen beobachtet werden:

1. schönentwickelte Oberflächenkolonien,
2. im Agar sich befindende, spindelförmige Kolonien,
3. sehr flache Kolonien zwischen Agar und Glas der Petrischalen.

Aus den 6 Einzelergebnissen der Platten wurde der Durchschnitt errechnet.

3. Versuche und Versuchsergebnisse

Von den Herstellern des Impfstoffes (Behringwerke) wird die Kühlschranklagerung (+ 2° bis 6° C) als optimal vorgeschrieben, wobei eine Verwendungsdauer von 3 Wochen gewährleistet ist. Deshalb sollen zunächst die aus meinen Versuchen erhaltenen Ergebnisse bei Kühlzellenlagerung, die gleichzei-

tig als Ausgangs- und Kontrollwerte für die weiteren Versuche (Tab. 2 und 3) dienen, besprochen werden.

a) Bestimmung der Keimzahl bei Lagerung in der Kühlzelle (2 - 5° C)

Die Untersuchungen wurden insgesamt in 3 Versuchsreihen durchgeführt. Die Impfstoffe jeder Versuchsreihe gehörten einer anderen Herstellungscharge an. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Die Abnahme der Zahl lebender Keime im Abortus-Bang-Flüssigimpfstoff bei Aufbewahrung in der Kühlzelle (2° - 5° C). (Durchschnittswerte aus 6 Beimpfungen)

Versuchsreihe		Keimzahl in Mrd/ccm nach Tagen												
		2	5	9	12	16	19	23	26	30	33	37	40	47
A	Einzelwerte	7,6	7,4	6,7	6,5	6,4	5,4	4,5	4,3	4,2	4,4	-	4,0	3,8
		8,1	7,3	7,0	6,0	5,9	5,9	4,2	4,7	4,1	4,2	-	3,9	4,1
		8,1	7,6	6,8	5,8	6,1	5,4	4,5	4,2	4,6	4,0	-	4,0	4,0
		7,7	7,2	6,5	6,5	5,9	5,2	4,5	4,6	4,5	4,3	-	4,4	4,0
		8,0	7,0	7,3	6,4	5,7	5,8	5,0	4,7	4,2	3,9	-	4,2	3,8
		7,7	7,3	7,0	5,8	5,9	5,7	4,5	4,0	4,3	-	-	4,3	4,5
	Durchschnittswerte	7,8	7,3	6,9	6,2	6,0	5,6	4,5	4,4	4,3	4,2*	0**	4,1	4,0
B	Einzelwerte	-	-	4,3	4,6	-	4,2	4,2	3,4	2,4	2,5	2,1	1,6	1,6
		-	-	4,8	4,0	-	4,0	4,0	2,7	2,0	2,4	1,8	1,8	1,4
		-	-	4,3	4,2	-	3,6	3,5	3,1	2,4	2,0	2,4	1,4	1,5
		-	-	4,4	4,0	-	3,8	3,6	3,0	2,5	2,1	2,0	1,8	1,7
		-	-	4,5	4,2	-	4,3	3,5	3,2	3,2	2,5	2,2	1,9	1,4
		-	-	4,6	4,6	-	4,0	3,8	3,1	2,5	2,4	2,2	1,6	1,5
	Durchschnittswerte	0**	0**	4,5	4,3	0**	4,0	3,8	3,1	2,3	2,3	2,1	1,7	1,5
F	Einzelwerte	5,2	4,6	4,2	4,4	3,5	3,5	3,4	3,7	3,1	2,9	2,7	2,4	-
		4,8	4,5	4,4	4,0	3,7	3,4	3,1	3,6	3,5	3,1	2,5	2,0	-
		4,7	4,2	4,0	4,0	4,0	3,5	3,8	3,4	3,2	2,9	2,4	1,9	-
		5,0	4,7	3,7	4,5	3,0	4,0	3,9	3,0	3,0	3,0	3,0	2,5	-
		4,7	4,5	4,4	4,4	3,7	3,4	3,7	3,2	3,1	2,7	2,5	2,1	-
		5,0	4,5	4,3	3,8	-	3,5	3,8	3,6	-	3,0	2,6	2,3	-
	Durchschnittswerte	4,9	4,5	4,2	4,2	3,6*	3,6	3,6	3,4	3,2*	2,9	2,6	2,2	0**
Gesamtdurchschnitt der Reihen A, B und F		6,4	5,9	5,2	4,9	4,8	4,4	4,0	3,6	3,3	3,1	0**	2,7	2,7

0** = Untersuchung nicht durchgeführt

* = Durchschnitt aus 5 Beimpfungen

Aus der Tabelle 1 geht hervor, daß sich die Impfstoffe in den verschiedenen Versuchsreihen hinsichtlich der Ausgangskeimzahl wesentlich unterscheiden. Da in Reihe B die Untersuchungen erst ab 9. Tag durchgeführt werden konnten, stehen diesbezüglich keine vergleichbaren Werte zur Verfügung. Auf Grund der in dieser Zeit erhaltenen Ergebnisse der Abnahme der Keimzahl in Reihe F kann in Reihe B auf einen entsprechenden Ausgangswert geschlossen werden. Gemäß der höheren Ausgangskeimzahl wies die Versuchsreihe A noch nach 47 Tagen eine Keimzahl von 4,0 Mrd/ccm auf, während die beiden übrigen Reihen (B und F) schon nach 40 Tagen auf 1,7 bzw. 2,3 Mrd/ccm abgefallen waren und somit nur noch annähernd die Hälfte der in Reihe A ermittelten lebenden Keime enthielten. Bei allen Versuchsreihen war jedoch innerhalb von 40 Tagen ein mehr oder weniger kontinuierliches Absinken der Zahl lebender Keime im Impfstoff festzustellen. Alle Impfstoffe hatten aber nach 3 Wochen noch eine weit höhere Keimzahl als 2,5 Mrd/ccm und erfüllten deshalb die an Lebendimpfstoffe hinsichtlich der Keimzahl gestellten Mindestforderungen. (D r a e g e r - mündl. Mitteilung).

b) Bestimmung der Keimzahl bei Lagerung unter Zimmertemperatur (20° - 25° C)

Für diese Untersuchungen wurden 2 Versuchsreihen angesetzt, die jeweils aus verschiedenen Herstellungschargen stammten. Die Impfstoffe wurden im Labor aufbewahrt. Die Einzelergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Die Abnahme der Zahl lebender Keime im Abortus-Bang-Flüssigimpfstoff bei Lagerung unter Zimmertemperatur (Labor, 20 - 25° C) (Durchschnittswerte aus 6 Beimpfungen)

Versuchsreihe		Keimzahl in Mrd/ccm nach Tagen										
		2	5	9	12	16	19	23	26	30	33	37
D	Einzelwerte	-	6,8	6,6	6,3	6,4	6,3	4,5	4,4	3,9	3,5	3,6
		-	6,3	6,4	6,1	6,1	6,0	4,1	4,0	3,4	3,0	2,6
		-	6,7	6,3	5,8	5,5	5,7	4,1	3,9	2,7	3,3	3,0
		-	6,5	6,4	6,0	5,8	6,0	4,3	4,2	3,2	3,0	3,3
		-	6,4	6,2	5,8	6,2	5,8	4,5	4,0	3,6	3,2	2,7
		-	6,4	6,4	6,2	-	6,2	4,2	4,3	3,4	3,1	3,0
	Durchschnittswerte	0 ‡‡	6,5	6,4	6,0	6,0 ‡	6,0	4,3	4,1	3,4	3,2	3,0
G	Einzelwerte	4,7	4,2	3,4	3,4	2,5	2,2	1,8	1,7	1,1	0,8	0,8
		4,1	3,6	3,2	2,8	2,6	1,7	1,9	1,4	0,9	0,9	0,6
		4,4	3,7	3,9	2,7	2,4	2,1	2,0	1,7	0,9	1,0	0,4
		4,3	3,1	3,5	3,0	2,1	2,2	1,8	1,9	1,3	1,2	0,5
		4,1	3,1	3,3	2,7	2,2	1,7	2,2	1,8	1,0	1,0	0,7
		4,2	3,6	3,1	3,1	2,4	-	1,9	1,7	1,0	1,2	0,6
	Durchschnittswerte	4,3	3,6	3,4	3,0	2,4	2,0 ‡	2,0	1,7	1,0	1,0	0,6
Gesamtdurchschnitt der Reihen D und G		0 ‡‡	5,0	4,9	4,5	4,2	4,0	3,2	2,9	2,2	2,1	1,8

‡‡ = Untersuchung nicht durchgeführt

‡ = Durchschnitt aus 5 Beimpfungen

Wie aus der Tabelle 2 zu entnehmen ist, fällt auch bei diesen Versuchsreihen die Keimzahl ziemlich kontinuierlich ab. Die Versuchsreihen unterscheiden sich bereits schon durch ihren Ausgangswert, der bei Reihe D wesentlich höher liegt als bei Reihe G. Der Impfstoff der Reihe G ist schon nach 16 Tagen auf 2,4 Mrd/ccm abgesunken, wodurch die Mindestkeimzahl (2,5 Mrd/ccm) unterschritten wurde. Dagegen verfügte der Impfstoff der Reihe D noch nach 37 Tagen über 3,0 Mrd/ccm lebende Keime.

c) Bestimmung der Keimzahl bei Lagerung im Kraftfahrzeug

Wie schon ausgeführt wurde, habe ich diese Art der Lagerung gewählt, da sie den Verhältnissen der Praxis entspricht, wo Impfstoffe oft längere Zeit im Kraftfahrzeug des praktischen Tierarztes aufbewahrt und zum Teil auch gelagert werden. Bei diesen Untersuchungen war der Impfstoff nicht nur Temperaturschwankungen von 10° C und mehr pro Tag ausgesetzt, sondern auch noch mechanischen Einflüssen wie z.B. Erschütterungen durch Fahren auf schlechten Wegstrecken usw. Es wurden daher für diese Untersuchungen 3 Versuchsreihen überprüft. In der Tabelle 3 sind die Versuchsergebnisse festgehalten.

Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist, sinkt auch bei dieser Art der Aufbewahrung die Keimzahl bei 2 Reihen (E und H) ziemlich kontinuierlich ab. Beide Versuchsreihen unterscheiden sich im wesentlichen nur durch ihre Anfangskeimzahl, die bei Reihe E etwa um 2 Mrd. höher ist als bei Reihe H. Bei der Versuchsreihe C, die wie die Versuchsreihe B des ersten Versuchsabschnittes erst am 9. Tag untersucht werden konnte, war bereits am 12. Tag ein jäher Keimabfall unter die Milliardengrenze festgestellt worden. Erst nachdem die Verdünnungen 10^{-7}, 10^{-6} und später 10^{-4} untersucht wurden, konnten Werte von 451 Mill. und nach 37 Tagen nur noch von 600 000 Keimen/ccm ermittelt werden. Die Ursache dieses rapiden Absinkens der Keimzahl der Reihe C wäre mit der Art der Aufbewahrung zu erklären, wenn nicht die Ergebnisse der unter gleichen Bedingungen geprüften Versuchsreihen E und H (insbesondere E) dieser Annahme widersprechen würden. Äußere Einflüsse zur Erklärung des plötzlichen Keimabfalls der Reihe C sind ebenfalls nicht ausschließlich verantwortlich zu machen, da fast gleichzeitig mit diesen Untersuchungen die Versuchsreihe E mit sehr langsamem Keimabfall durchgeführt worden ist. Da die Versuchsreihe C völlig abweichende Ergebnisse brachte, ist

sie in den Durchschnittswerten nicht berücksichtigt worden.

4. Untersuchungen über die Dissoziation der Impfstoffe bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Sämtliche Impfstoffe wurden nach der Untersuchung auf den Gehalt an lebenden Keimen gleichzeitig auch auf ihren jeweiligen Dissoziationsgrad hin geprüft. Ich habe von den Methoden, die in der Literatur angeführt sind, für meine Arbeit diejenigen ausgewählt, die mir als sicher und objektiv und vor allen Dingen auch für Reihenuntersuchungen am zweckmäßigsten erschienen.

Da die Spontanagglutination mit Trypaflavin 1 : 1 000 als eine sehr empfindliche Methode (K r a f z e l) bezeichnet wird, was ich unter anderem auch in meinen Vorversuchen bestätigen konnte, wurden mit dieser Methode alle Versuchsreihen von der ersten bis zur letzten Keimzählung durchgeprüft. Gleichzeitig habe ich noch die Agglutination mit n/HCl (S c h i n d l e r) durchgeführt. Die Versuchsreihen F, G und H (alle drei Reihen gehören derselben Charge an) wurden noch zusätzlich durch die Vitalfärbung mit Kristallviolett auf ihren jeweiligen Dissoziationsgrad geprüft. Die Vitalfärbung ist, wie Vor- und Hauptversuche erwiesen, eine ebenfalls sehr exakte Methode und erlaubt außerdem noch eine quantitative Auswertung des Dissoziationsgrades, da sich S-, R- und I-Formen sehr gut unterscheiden lassen.

Vor dem Beginn der Hauptversuche habe ich auf diese Weise 18, teils ältere, teils frisch isolierte Bang-Stämme auf ihren Dissoziationsgrad hin untersucht, um mich mit den Methoden vertraut zu machen und die nötige Erfahrung zu erwerben. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Die Abnahme der Zahl lebender Keime im Abortus-Bang-Flüssigimpfstoff bei Lagerung im Kraftfahrzeug

(Durchschnittswerte aus 6 Beimpfungen)

Versuchsreihe		Keimzahl in Mrd/ccm nach Tagen										
		2	5	9	12	16	19	23	26	30	33	37
C	Einzelwerte	-	-	4,8	0,2	0	0					
		-	-	4,3	0,3	0	0	Einzelwerte nicht vermerkt, da aus verschiedenen				
		-	-	4,6	0,1	0	0	Verdünnungsstufen ermittelt.				
		-	-	4,3	0,3	0	0					
		-	-	4,9	0,3	0	0					
		-	-	4,2	0,3	0	0					
	Durchschnittswerte	0 ‡‡	0 ‡‡	4,5	0,3	<0,1	<0,1	0,0005	0,0004	0,00006		0
E	Einzelwerte	-	6,8	5,8	5,7	5,7	5,7	4,6	4,4	4,0	4,0	4,0
		-	6,5	6,3	5,9	5,8	6,5	4,5	4,0	4,4	3,9	4,5
		-	6,2	6,2	6,0	6,0	6,0	4,4	4,2	4,0	4,4	4,4
		-	6,5	5,9	6,2	6,1	6,2	4,6	4,6	4,6	4,4	4,1
		-	6,7	6,0	6,4	6,2	5,8	4,0	4,8	4,0	4,2	3,9
		-	6,4	6,5	-	6,3	6,0	4,1	4,2	4,3	4,1	4,0
	Durchschnittswerte	0 ‡‡	6,5	6,1	6,0 ‡	6,0	6,0	4,4	4,4	4,2	4,2	4,1
H	Einzelwerte	5,1	4,5	4,0	3,6	2,7	2,3	2,3	1,7	1,5	0,9	0,6
		4,5	4,5	3,7	3,3	2,6	2,2	1,7	1,6	1,0	0,7	0,4
		4,6	4,1	4,0	3,0	2,3	2,0	2,0	1,5	1,1	0,8	0,2
		4,8	3,8	3,6	3,6	2,4	1,8	1,7	1,2	1,3	0,6	0,3
		5,0	3,8	3,9	3,1	2,1	1,7	1,8	1,2	1,2	0,5	0,5
		4,9	4,2	3,8	3,3	2,4	-	1,7	1,6	1,0	0,7	0,4
	Durchschnittswerte	4,8	4,2	3,8	3,3	2,4	2,0 ‡	1,9	1,5	1,2	0,7	0,4
Gesamtdurchschnitt der Reihen E und H		0 ‡‡	5,4	5,0	4,7	4,2	4,0	3,2	3,0	2,7	2,5	2,3

0 ‡‡ = Untersuchung nicht durchgeführt

‡ = Durchschnittswert aus 5 Beimpfungen

Tabelle 4: Vorversuche zur Bestimmung des Dissoziationsgrades alter und frisch isolierter Brucella-Abortus-Stämme

Bezeichnung der Bangstämme	Spontanagglutination		Farbe der Kolonien bei Vitalfärbung mit Kristallviolett	Dissoziationsform Ergebnis
	Trypaflavin 1: 1 000	n/HCl		
B_3	-	-	blau	S
B_4	-	-	blau	S
B_7	-	-	blau	S
B_8	-	-	blau	S
B_9	+++	++	50 % rot 50 % blau	S und R
B_{10}	++	(-)	blau + Kol. mit viol. Sektoren	S und I
B_{11}	+++	+++	rot	R
B_{12}	(-)	(-)	blau	S
B_{13}	(-)	(-)	blau	S
B_{14}	(-)	-	blau	S
B_{15a}	(-)	-	blau	S
B_{15b}	-	-	blau	S
B_{16a}	-	-	blau	S
B_{24}	-	-	blau + vereinz. Kol. m. viol. Sektoren	S u. vereinz. I
B_{26}	-	-	blau	S
B_{27}	+++	++	50 % rot 50 % blau	S und R
B_{28}	-	-	blau	S
B_{29}	-	-	blau	S

Von den 18 Bang-Stämmen waren auf Grund dieser Untersuchungsmethoden 13 völlig undissoziiert und somit reine S-Formen. Der Stamm "B_{11}" bestand nahezu ganz aus R-Formen, während die Stämme "B_9" und "B_{27}" ungefähr zu 50 % dissoziiert waren. Beim Stamm "B_{24}" verlief die Spontanagglutination sowohl mit Trypaflavin als auch mit n/HCl negativ, während bei der Vitalfärbung doch einige violettgefärbte Kolonien und damit I-Formen nachzuweisen waren.

In meinen Hauptversuchen ging ich bei der Prüfung des Dissoziationsgrades im einzelnen wie folgt vor: Nachdem aus den Impfstoffampullen 1 ccm Impfstoff für die Keimzählung entnommen worden war, habe ich den Rest des Impfstoffes (4 ccm) in ein Zentrifugenglas gegeben und 15 Min. bei 3 000 U/Min. zentrifugiert. Von dem Sediment wurde anschließend mit einer Öse Material entnommen und mit einem Tropfen einer bereitstehenden Trypaflavinlösung 1 : 1 000 auf einem Objektträger verrieben. Nach vorsichtigem Schwenken des Objektträgers wurde die Reaktion mit und ohne Lupe abgelesen. Denselben Vorgang wiederholte ich mit einem Tropfen n/HCl-Lösung.

Außerdem legte ich aus der Flasche Nr. 2 der Verdünnungsreihe (Verdünnung 10^{-4}) mit einer dreieckig geformten Platinöse (Kantenlänge 10 mm) je einen Impfstrich auf zwei bereitstehenden Baktotryptoseplatten an. Nach 72stündiger Bebrütungszeit bei 37° C prüfte ich die gewachsenen Kolonien ebenfalls mit der Trypaflavinlösung und n/HCl wie oben beschrieben auf ihren Dissoziationsgrad. Die Verdünnung 10^{-4} hat sich deshalb als günstig erwiesen, weil der Ausstrich zu einer genügend großen Zahl schöngewachsener Einzelkolonien führte, ein Kolonienrasen aber stets vermieden werden konnte.

Anschließend führte ich bei den Reihen F, G und H die Vitalfärbung mit Kristallviolett durch, indem ich dieselben Agarplatten nach der durchgeführten Spontanagglutination 20 Sek. lang mit einer wässerigen Kristallviolettlösung (1 : 2 000) überschichtete. Nach 20 Sek. wurde die Farblösung wieder vorsichtig abgeschüttet. Hatten sich die Kolonien entsprechend durchgefärbt, so wurde der Impfstrich unter dem Plattenmikroskop bei der Beleuchtung nach H e n r y betrachtet.

Die Durchschnittsergebnisse aller Versuchsreihen für die gesamte Versuchsdauer von 37 bis 47 Tagen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Durchschnittsergebnisse der Untersuchung des Dissoziationsgrades des Lebendimpfstoffes während der Prüfung von 40 bzw. 47 Tagen bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Versuchsreihe		Spontanagglutination Trypaflavin 1:1000 a)	Spontanagglutination Trypaflavin 1:1000 b)	Spontanagglutination n/HCl a)	Spontanagglutination n/HCl b)	Vitalfärbung mit Kristallviolett (Farbe der Kolonien)	Dissoziationsformen
Kühlzelle	A	-	-	-	-	0 ≠	S
	B	-	-	-	-	0 ≠	S
	F	-	-	-	-	blaue Kolonien + vereinz.viol.Kol. + Kol.m.viol.Sektoren	S und I
Zimmertemperatur	D	-	-	-	-	0 ≠	S
	G	-	-	-	-	blaue Kolonien + vereinz.viol.Kol. + Kol.m.viol.Sektoren	S und I
Kraftfahrzeug	C	-	-	-	-	0 ≠	S
	E	-	-	-	-	0 ≠	S
	H	-	-	-	-	blaue Kolonien + vereinz.viol.Kol. + Kol.m.viol.Sektoren	S und I

0 ≠ = Vitalfärbung wurde nicht durchgeführt

a) = Entnahme der Keime aus dem Sediment

b) = Entnahme der Keime von den beimpften Platten

Aus der Tabelle 5 geht hervor, daß bei sämtlichen Versuchsreihen die Spontanagglutination sowohl mit Trypaflavin, als auch mit n/HCl negativ verlaufen war. Bei der Vitalfärbung mit Kristallviolett, die bei den Versuchsreihen F, G und H noch zusätzlich angewendet worden war, konnten unter der Vielzahl der blauen Kolonien (S-Formen) vereinzelt violett gefärbte und zum Teil auch Kolonien mit violettgefärbten keilförmigen Sektoren beobachtet werden. Es handelte sich dabei um I-Formen (U l b r i c h). Die Anzahl dieser Kolonien war so gering, daß sie weit unter der 1 %-Grenze lag. Ein vermehrtes Auftreten dieser I-Formen nach längerer Lagerzeit konnte bei keiner der Versuchsreihen beobachtet werden. Es ist daraus zu schließen, daß die Impfstoffe alle in nahezu völlig undissoziiertem Zustand waren und daß sie auch bei ungünstigen Lagerungsbedingungen (Labor, Kraftfahrzeug) nicht vermehrt abdissoziieren.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Meine Versuche haben gezeigt, daß bei den verschiedenen Lagerungsbedingungen des Lebendimpfstoffes nach gewisser Zeit Unterschiede in der Keimzahl zu beobachten waren. Da die einzelnen Impfstoff-Chargen sich aber hinsichtlich der Ausgangskeimzahl unterscheiden, kommt es darauf an, die den Lagerungsbedingungen entsprechende unterschiedliche Abnahme der Keimzahl innerhalb der gleichen Herstellungschargen zu vergleichen. Dazu wurden 3 Herstellungschargen in nachfolgender Tabelle 6 zusammengefaßt.

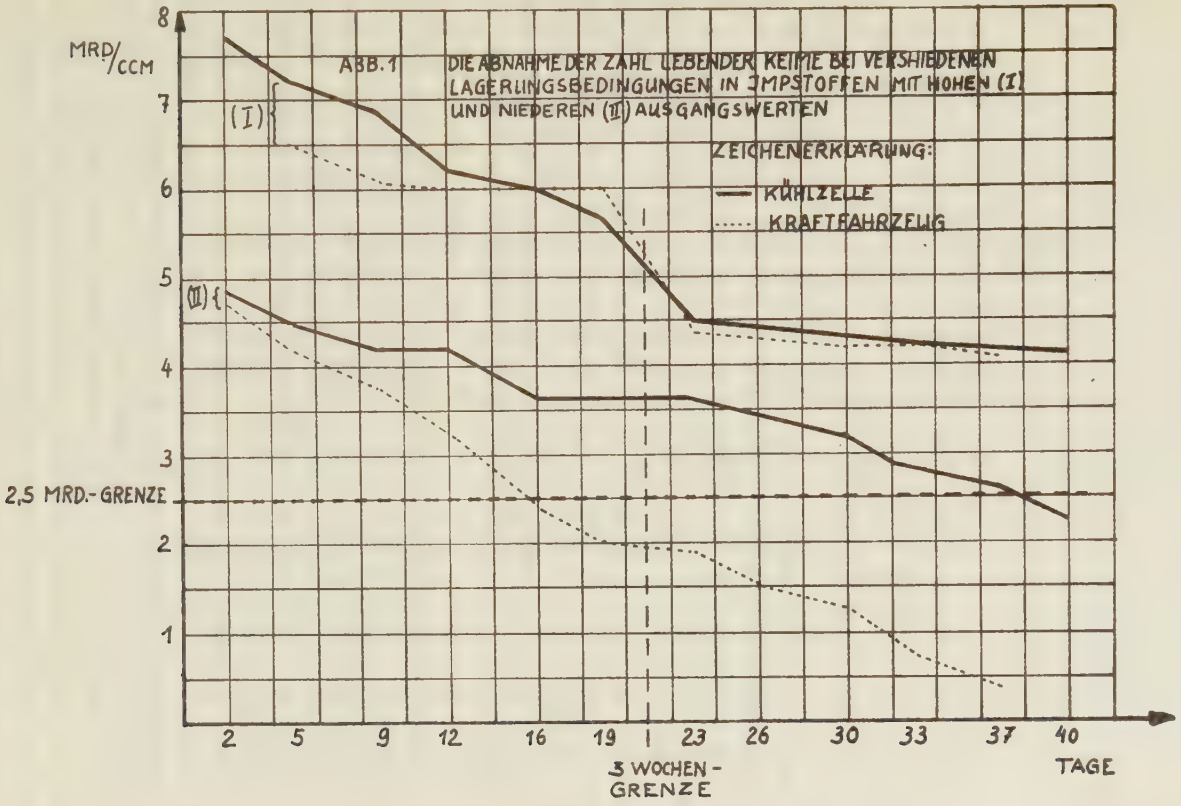
Tabelle 6: Die Abnahme der Zahl lebender Keime der einzelnen Herstellungschargen

Versuchs-reihe		Keimzahl in Mrd/ccm nach Tagen											
		2	5	9	12	16	19	23	26	30	33	37	40
Charge II	B_K	0 ‡‡	0 ‡‡	4,5	4,3	0 ‡‡	4,0	3,8	3,1	2,3	2,3	2,1	1,7
	C_{Kfz}	0 ‡‡	0 ‡‡	4,5	0,3	<0,1	<0,1	0,0005	0,0004		0,00006	0	0 ‡‡
Charge III	D_Z	0 ‡‡	6,5	6,4	6,0	6,0 ‡	6,0	4,3	4,1	3,4	3,2	3,0	0 ‡‡
	E_{Kfz}	0 ‡‡	6,5	6,1	6,0 ‡	6,0	6,0	4,4	4,4	4,2	4,2	4,1	0 ‡‡
Charge IV	F_K	4,9	4,5	4,2	4,2	3,6 ‡	3,6	3,6	3,4	3,2 ‡	2,9	2,6	2,2
	G_Z	4,3	3,6	3,4	3,0	2,4	2,0 ‡	2,0	1,7	1,0	1,0	0,6	0 ‡‡
	H_{Kfz}	4,8	4,2	3,8	3,3	2,4	2,0 ‡	1,9	1,5	1,2	0,7	0,4	0 ‡‡

0 ‡‡ = Untersuchung nicht durchgeführt
‡ = Durchschnitt aus 5 Beimpfungen
K = Kühlzelle
Z = Zimmertemperatur
Kfz = Kraftfahrzeug

Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, waren innerhalb der 3 Herstellungschargen die Ausgangswerte verschieden. Die höchsten Werte wies Charge III auf. Die Abnahme der Keimzahl erfolgte bei dieser Charge nur langsam, obwohl die Impfstoffe D und E bei Zimmertemperatur bzw. im Kraftfahrzeug gelagert worden waren. Bemerkenswerterweise lagen die Endwerte der Keimzählungen bei Lagerung im Kraftfahrzeug noch über den bei Zimmertemperatur ermittelten Werten. Charge IV wies demgegenüber Ausgangswerte zwischen 4,3 und 4,9 Mrd/ccm auf, also um ungefähr 1,5 bzw. 2 Mrd/ccm niederer als Charge III. Während hier die Abnahme der lebenden Keime bei Lagerung im Kraftfahrzeug und bei Zimmertemperatur relativ rasch erfolgte, ging die Keimzahl bei Kühlzellenlagerung viel langsamer zurück, so daß in den Endwerten beträchtliche Unterschiede auftraten. Bei der erstmals nach 9 Tagen geprüften Charge II wurde ein langsames Absinken bei Kühlzellenlagerung (etwa Reihe F der Charge IV entsprechend), dagegen eine rapide Abnahme der Keimzahl bei Lagerung im Kraftfahrzeug festgestellt.

Die Ergebnisse lassen vermuten, daß der Initial-Keimzahl eine wesentliche Bedeutung für die Verwendungsdauer der Impfstoffe zukommt. In der nachfolgenden Abb. 1 ist diese Erscheinung deutlich erkennbar. Es wurden vergleichend 2 Versuchsreihen mit hoher und mit niedriger Initialkeimzahl in Kurvenpaaren wiedergegeben, wobei jeweils die ausgezogene Kurve den Abfall der Keimzahl bei Lagerung in der Kühlzelle, und die gestrichelte Kurve den Abfall der Keimzahl bei Lagerung im Kraftfahrzeug anzeigt. Die beiden Kurven des Kurvenpaares I verfügen über hohe Anfangswerte und entsprechen den Versuchsreihen A und E, während das Kurvenpaar II verhältnismäßig niedere Anfangswerte aufweist, die auf den Werten der Versuchsreihen F und H (beide gehören derselben Charge an) basieren.


MRD/CCM
8
7
6
5
4
3
2
1
(I)
(II)
2,5 MRD.-GRENZE
ABB. 1
DIE ABNAHME DER ZAHL LEBENDER KEIME BEI VERSHIEDENEN LAGERUNGSBEDINGUNGEN IN IMPSTOFFEN MIT HOHEN (I) UND NIEDEREN (II) AUSGANGSWERTEN
ZEICHENERKLÄRUNG:
KÜHLZELLE
KRAFTFAHRZEUG
2
5
9
12
16
19
23
26
30
33
37
40
TAGE
3 WOCHEN-GRENZE

Man sieht, daß der Keimabfall bei hoher Anfangskeimzahl (Kurvenpaar I) sowohl bei Zimmertemperatur als auch im Kraftfahrzeug ziemlich gleich verläuft. Die Kurven weisen selbst nach 37 Tagen kaum eine Divergenz auf. Beim Kurvenpaar II mit niederer Anfangskeimzahl divergiert dagegen der Kurvenverlauf erheblich, so daß ein bedeutend schnelleres Absinken der Werte bei Lagerung im Kraftfahrzeug festzustellen ist. Andererseits ergibt sich aus Tab. 6 und nachfolgender Abb. 2, daß sich im Durchschnitt die bei Zimmertemperatur und im Kraftfahrzeug gelagerten Impfstoffe hinsichtlich ihres Keimabfalls ziemlich gleich verhielten. Man kann also aus obigem den Schluß ziehen, daß Impfstoffe mit hoher Anfangskeimzahl bei allen drei Lagerungsbedingungen in Bezug auf Keimzahl der von der Herstellerfirma angegebenen Verwendbarkeitsdauer entsprechen und diese sogar nahezu um das doppelte überschreiten, wenn eine Mindestkeimzahl von 2,5 Mrd/ccm zugrunde gelegt wird. Impfstoffe jedoch, deren Jnitialkeimzahl unter 6 Mrd/ccm liegt, sind zwar bei Kühlzellenlagerung über 3 bzw. 4 Wochen haltbar, bei Lagerung im Kraftfahrzeug oder bei Zimmertemperatur wird die Mindestkeimzahl von 2,5 Mrd/ccm dagegen oft schon vor der angegebenen 3-Wochengrenze unterschritten.

In Abb. 2 sind die Mittelwerte, die aus den einzelnen Versuchsreihen bei den verschiedenen Lagerungsbedingungen (Tab. 1, 2 und 3) errechnet wurden, einander gegenübergestellt.

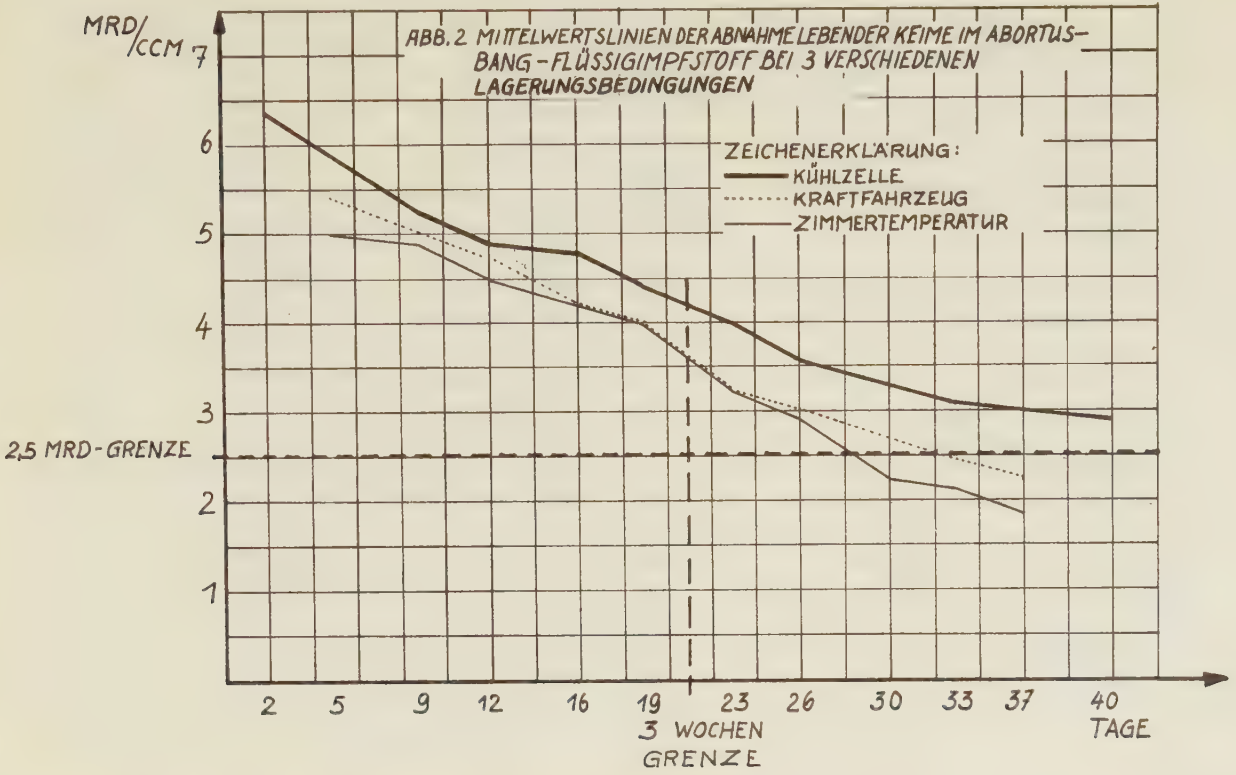


ABB. 2 MITTELWERTSLINIEN DER ABNAHME LEBENDER KEIME IM ABORTUS-BANG-FLÜSSIGIMPFSTOFF BEI 3 VERSCHIEDENEN LAGERUNGSBEDINGUNGEN

Aus Abb. 2 geht hervor, daß alle 3 Mittelwerte zu Anfang ungefähr bei 6 Mrd/ccm liegen und somit der Vorschrift entsprechen. Die Impfstoffe, die bei Zimmertemperatur und im Kraftfahrzeug gelagert wurden, unterschieden sich gegenseitig hinsichtlich der Keimzahlabnahme kaum. Die Keimzahl nimmt jedoch bei diesen Lagerungsbedingungen gegenüber der Kühlzellenlagerung im Gesamten betrachtet rascher ab. Da die Keimzahl bei Kühlzellenlagerung nach einiger Zeit stets höher lag, als bei den beiden anderen Lagerungsbedingungen, und da außerdem eine Versuchsreihe (Reihe C, Tab. 6) bei Lagerung im Kraftfahrzeug schon nach 12 Tagen unter die Milliarden-Grenze abgesunken war, ergibt sich als praktische Nutzanwendung der Untersuchungen, daß der praktische Tierarzt den flüssigen Impfstoff bis zur Verwendung im Kühlschrank oder zumindest in Kellerräumen aufbewahren und genauer auf die angegebene Haltbarkeitsdauer von 3 Wochen achten sollte.

V. Zusammenfassung

1. Bei 4 verschiedenen Chargen flüssiger Brucella-Abortus-Lebendimpfstoffe, die unter verschiedenen Bedingungen (Kühlschrank, Zimmertemperatur und Kraftfahrzeug) gelagert waren, wurden während eines Zeitraumes von 8 Wochen in 3 bis 4-tägigen Abständen im Plattengußverfahren Keimzählungen vorgenommen und der Dissoziationsgrad untersucht.

2. Es konnte festgestellt werden, daß bei sämtlichen geprüften Impfstoffen im Laufe der Zeit eine Verminderung der Zahl lebender Keime eintritt und die Verwendbarkeit der Lebendimpfstoffe somit begrenzt ist.

3. Bei Lagerung der Impfstoffe in der Kühlzelle trat regelmäßig der langsamste Keimabfall ein. Aufbewahrung bei Zimmertemperatur und im Kraftwagen beschleunigte den Keimabfall in unterschiedlichem Maße, er erfolgte aber stets rascher als bei Aufbewahrung im Kühlschrank.

4. Die Untersuchungen zeigten, daß nicht nur die Lagerungsbedingungen, sondern auch die Anfangskeimzahl eine wesentliche Bedeutung für die Haltbarkeit der Impfstoffe besitzt. Impfstoffe mit hoher Anfangskeimzahl erwiesen sich trotz ungünstiger Lagerungsbedingungen (Kraftfahrzeug und Zimmertemperatur) länger haltbar, als Impfstoffe mit niedrigerer Anfangskeimzahl bei Kühlzellenlagerung.

5. Da eine rapide Abnahme lebender Keime bei niederer Anfangskeimzahl und gleichzeitiger Lagerung im Kraftfahrzeug in einem Falle nachgewiesen wurde, ist es unter praktischen Verhältnissen zu vermeiden, Impfstoffe längere Zeit, namentlich während der Sommermonate, im Kraftfahrzeug aufzubewahren.

6. Eine Zunahme von Dissoziationsformen konnte bei den verschiedenen Lagerungsbedingungen in keinem Falle nachgewiesen werden.

Zum Schlusse meiner Arbeit möchte ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. A. Meyn, für die Überlassung dieses Themas und für die gleichzeitig freundlich gewährte Unterstützung aufrichtig danken.

Gleichzeitig erlaube ich mit, Herrn OReg.Vet.Rat Dr. O. Scheu, Vorstand des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Stuttgart und seinen Mitarbeitern für die mir in liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellten Arbeitsräume und Geräte, sowie für die förderlichen Anregungen und Hinweise meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Des weiteren gilt mein verbindlichster Dank der Firma Behringwerke, insbesondere Herrn Dr. Draeger, für den mir bereitwillig zur Verfügung gestellten Impfstoff.

VI. Literatur

1. Bergmann, I.: Beitrag zur Frage der Prüfung und Anwendung gefriergetrockneter Brucella-Abortus-Impfstoffe (Stamm Buck 19). Schweiz.Arch.Tierheilkunde 97, 72-85, 1955.

2. Börger, K.: Die Verwendung von Tetrazolpurpur Nährböden zur Züchtung von Brucellen. T.U. 1956, Nr. 6, 228

3. Braun, W.: Variation in the genus Brucella. "Brucellosis". Americ.Assoc.for the Advancement of science Washington 5, D.C., S. 26, 1950.

4. Cotton, C.M.: The microscopic identification of smooth and variant forms of Brucella. VI.Int.Kongr.Mikrobiol.Rom 1953, VI, 144-146. Ref.Zbl.f.Bakt.Ref. 164, 434, 1957.

5. Draeger, K.: Anweisung für die Bestimmung der Keimzahl bei Brucella abortus, insbesondere des gefriergetrockneten Abortus-Bang-Impfstoffes (Stamm Buck 19). Briefl.Mittlg. 1956.

6. Frendzel, J. und Szymanowski, Z.: Zur Differenzierung der S- und R-Stämme der Brucella Bang. Zbl.Bakt.Orig.119, 1930/31, S. 455-459

7. Henry, B.S.: Dissociation in the genus Brucella. J.Infekt. Dis. 52, 374, 1933.

8. Huddleson, J.F.: Brucellosis in Man and Animals. The Commenwealth Fund, New York 1943.

9. Huddleson, J.F. und Bennet, G.R.: The vaccinal immunizing value of a Mucoid Phase of Brucella suis against Brucellosis in cattle. Mich. Agr. Exp.Stat.Quarterly Bull. 31, 1948, 139-156.

10. Huddleson, J.F.: Zit. nach Nr. 15.

11. Krafzel, E.: Untersuchungen über die Dissoziation der Brucella abortus Bang. Vet. Diss. Gießen, 1952.

12. Marshal, M.S. and Jared, D.: Microbic dissociation in the Brucella-group. J.Inf.Dis. 49, 1931, 318-336. Ref.Zbl.Bakt.Ref. 106, 1932, 116.

13. Munger, Myrtle und Huddleson, I.F.: The detection antigenic variants of Brucella by means of an Opsonocytophagic test. J.Bact. 35, 255. Ref.Zbl.f.Bakt.Ref. 130, 168, 1938.

14. Pandit, S.R. and Wilson, G.S.: The relation between specific and non-specific agglutination in the Brucella-group. J.Hyg. 32, 1932, 45-54. Ref.Zbl.Bakt.Ref. 107, 1932, 402.

15. Patz, H.: Die Unterscheidung der Typen (Arten) in der Gattung Brucella unter Berücksichtigung des Formenwechsels. Vet. Diss. München, 1955.

16. Plastridge, W.N. and Mc Alpine, I.G.: Microbic dissociation in the Abortus-Melitensis-group. Observations on the Mucoid form. J.Inf.Dis. 46, 1930, 315-323. Ref.Zbl.Bakt.Ref. 102, 1931, 254.

17. Priestley und Mc Even: Zit. nach Nr. 18.

18. Schindler, R.: Untersuchungen über die Bedeutung der bakteriellen Dissoziation für den Wert des Lebendimpfstoffes gegen die Brucellose der Rinder. Behringwerk-Mitteilungen, Heft 26, 115, 1952.

19. Seelemann, M. und Meyer, A.: Zur Standardisierung von Abortus-Bang- Impfstoffen I und II. B.M.T.W., 236 u. 425, 1943.

20. Seelemann, M.: Praktische Probleme der Brucellosebekämpfung II. B.M.T.W., 393, 1956.

21. Traum, I.: The control of Brucellosis in animals by the use of vaccine. "Brucellosis". Americ.Assoc.for the advancement of Science. Washington 5, D.G. S. 225.

22. Ulbrich, F.: Vitalfärbung der Dissoziationsformen von Bakterienkulturen in der Mikro- und Makrokultur. Zbl.Bakt.Orig. 169, 221, 1957.

23. Verwey, W.F. and Matt, Cl.: Viability of restored desiccated brucella abortus vaccine. I.amer.vet.Assoc. 116, 296, 1950.

24. WHO: Übersicht über die von dem vereinigten Fachausschuß für die Brucellose der WHO/FOA angegebenen Richtlinien und Empfehlungen für die Diagnose und Bekämpfung der Brucellose. Von R. Schindler. Wissensch.Beitr. für die tierärztl. Praxis; Abortus-Bang (Brucellose) 1954.

25. White, P.G. und Wilson, I.B.: Differentiation of smooth and nonsmooth colonies of Brucella. J.Bact. 61, 239-240, 1951.

26. Wundt, W.: Die Laboratoriumsdiagnose der Bang'schen Krankheit und des Maltafiebers. Vortrag; gehalten im Okt. 1957 im Katharinenhospital Stuttgart.

Lebenslauf

Am 6. September 1932 wurde ich als Sohn des Baumeisters Hermann Haug und seiner Ehefrau Mathilde, geb. Herrmann in Ludwigsburg geboren.

In Schwäbisch Gmünd besuchte ich von 1938 bis 1942 die Grundschule und anschließend die dortige Oberschule für Jungen bis Ende 1944. 1945 trat ich in die Mörike-Oberschule in Ludwigsburg ein, wo ich im Frühjahr 1952 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1952/53 immatrikulierte ich mich an der Universität München als Student der Tiermedizin. Dort legte ich nach vier Fachsemestern die Tierärztliche Vorprüfung ab. Nach neun Fachsemestern beendigte ich mein Studium in München mit der Tierärztlichen Prüfung im Juli 1957.